

REC'D 15 NOV 2000  
WIPO PCT

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/05722  
09/830123  
22.09.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年 8月24日

EJU

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第236800号

出願人  
Applicant(s):

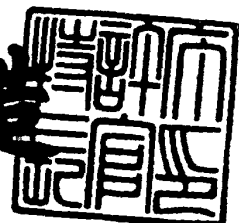
サントリー株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3087532

【書類名】 特許願

【整理番号】 994020

【提出日】 平成11年 8月24日

【あて先】 特許庁長官 伊佐山 建志 殿

【国際特許分類】 C12N 15/29

【発明の名称】 液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子

【請求項の数】 12

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県岡崎市竜美南 2 - 4 - 1 - 3 - 2 1

    【氏名】 飯田 滋

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県岡崎市明大寺町字狐塚 1 4 - 2 - B 3 0 3

    【氏名】 田中 幸子

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県岡崎市久後崎町宮下 2 城南ハイツ 1 0 5

    【氏名】 稲垣 善茂

【特許出願人】

    【識別番号】 000001904

    【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100077517

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 石田 敬

    【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

    【識別番号】 100087871

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9718791

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物細胞の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子。

【請求項 2】 配列番号：2 記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子、あるいは配列番号：2 記載のアミノ酸配列に対して 1 個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／または他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。

【請求項 3】 配列番号：2 記載のアミノ酸配列に対して 20% 以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。

【請求項 4】 配列番号：2 記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸の一部または全部に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする請求項 1 に記載の遺伝子。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。

【請求項 6】 請求項 5 記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子によってコードされる蛋白質。

【請求項 8】 請求項 7 記載の宿主細胞を培養し、又は生育させ、そして該宿主細胞から液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法。

【請求項 9】 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子、または請求項 5 記載のベクターが導入され形質転換された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織。

【請求項 10】 請求項 9 に記載の植物又はこれと同じ性質を有するその子

孫の切り花。

【請求項 11】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子、または請求項 5 記載のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、液胞の pH を制御する方法。

【請求項 12】 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の遺伝子、または請求項 5 記載のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、植物体の花の色を調節する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子およびその利用方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

花き産業においては、顕花植物の新規なあるいは多様性に富んだ新品種の開発が重要であり、なかでも、花の色は花きの最も重要な形質のひとつである。交配による従来の育種により、さまざまな色の品種が育種されてきたが、単一の植物種がすべての色の品種を有することはまれであり、さまざまな色の品種開発が望まれている。

【0003】

花の色の主な成分は、アントシアニンと総称されるフラボノイドの一群の化合物である。植物には多様なアントシアニンが存在することは知られており、それらの多くの構造が既に決定されている。アントシアニンの色は、一部は、その構造に依存している。アントシアニンの生合成に関わる酵素や遺伝子に関しても研究が進んでおり、分子生物学的手法と植物への遺伝子導入により、アントシアニンの構造を変換し、花の色を変えた例もある (Plant Cell, 7 (1995) Holton and Cornish, p.1071、Plant Cell Physiology 39 (1998) Tanaka et al, p.1119.)。また、アントシアニンの色は、水溶液の pH にも依存し、同じアントシアニンでも水溶液の pH が中性から弱いアルカリ性で青く見える (現代化学、(1998年5月))

本田と斉藤、p.25)。

【0004】

アントシアニン細胞の液胞に存在するため、液胞のpHが花の色に大きな影響を与えることも知られている (Plant Cell, 7 (1995) Holton and Cornish, Trends Plant Sci. 3 (1998) Mol et al. p212)。たとえば、アサガオ (*Ipomea tricolor*) においては、赤紫色のつぼみが開花したときに青くなるのは、花卉上皮細胞の液胞のpHが6.6 から7.7 に上昇するためであることが知られている (Nature, 373 (1995), Yoshida et al. p291)。

【0005】

植物細胞の液胞はおもに液胞プロトン輸送ATPaseと液胞プロトン輸送ピロフオスファターゼによって制御されているとされる (The Plant Vacuole, (1997) Leigh et al. Academic Press) が、これらのプロトンポンプが花の色にどのように関わっているかは明確ではない。また、ナトリウムイオン-プロトンアンチポーター (以下、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターと記載) が植物の液胞に存在すること、また、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターは、液胞の外と中のプロトン濃度勾配に依存してナトリウムイオンを液胞内に輸送し、その際プロトンが液胞外に輸送され、プロトン濃度勾配が減少することが知られていた。

【0006】

さらに、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターは、分子量約17万の蛋白質であることが示唆されていた。しかしながら、液胞のpHの制御には多くの未知の要因があり、どのようにして液胞、特に花卉液胞のpHが制御されているのかは、不明確である (以上The Plant Vacuole, (1997) Leigh et al. Academic Press)。また、植物液胞のpHを人為的に上昇させ、産業上有用な形質が得られたこともなく、花の色との関連も不明である。

【0007】

また、分子量約7 万の $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子がアラビドプシスからクローニングされ、この遺伝子を導入した酵母は耐塩性を獲得したことは知られているが (Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96 (1999) Gaxi la et al. p1480~1485)、このアンチポーターが植物細胞の液胞のpHを制御しているかどうか、あるい

は花の色に関わっているかどうかは知られていない。

【0 0 0 8】

一方、ペチュニアには花卉の液胞のpH制御に関わっている遺伝子座が7 種あることがわかっており、これらのうちの一つがホモの劣性になることにより花卉の液胞のpHが上昇するとされている (Plant J. 13 (1998) van Houwelingen et al . P39, Trends Plant Sci. 3 (1998) Mol et al. p212) 。そのうちの一つPh6 はすでにクローン化されていて、転写調節因子の一種であることがわかったが ( Plant Cell 5 (1993) Chuck et al.p371) 、実際にどのような生化学的な機構で液胞のpHを制御しているかは不明である。

【0 0 0 9】

また、アサガオ (*Ipomea nil*) においては、変異体の解析から花と葉の色や形に関わる遺伝子座がいくつかあり、これらのうち1 9 が易変異性であることが知られている (植物細胞工学シリーズ5 (1996) p132, 飯田ら 秀潤社、Annal. New York Acad. Sci., (1999) Iida et al. p870) 。これらの内で、青色ではなく紫色の花を咲かせるようになった劣性の変異により規定される1 遺伝子座をPurple 遺伝子座と呼び (T. Hagiwara (1931) The genetics of flower colours in *Pharbitis nil*. J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo 51, 241-262.; Y. Imai (1931) Analysis of flower colour in *Pharbitis nil*. J. Genet., 24: 203-224.) 、紫の花弁に青いセクターを生じる花を咲かせる易変性変異のアリールは、purple-mutable (pr-m) と名付けられた (J. Coll. Agric. Imp. Univ. Tokyo, 12 (1934) Imai, p479)。

【0 0 1 0】

この青い部分は劣勢のpurpleからの体細胞復帰突然変異により生じたと考えられ、さらに生殖細胞復帰突然変異体も分離できる。これら復帰突然変異体の復帰突然変異により生じたアリールをここではPurple-revertant (Pr-r) と名付ける。このような古典遺伝学的解析は、このPurple遺伝子に関しては行われていたが、このPurple遺伝子の実体や花卉液胞のpHの調節との関連等は全く不明であった。

【0 0 1 1】

液胞のpHを改変できれば、たとえば液胞のpHを上昇させることにより、花の色

を青くすることができるであろうと考えられる。青い色のない植物種の代表例として、バラ、キク、カーネーション、ガーベラなどがあり、これらはきわめて重要な切り花である。液胞pHの改変の重要性は認識されてきたが、いままでに花卉の液胞のpHを制御する蛋白質の実態は不明であり、これをコードする遺伝子の単離が望まれていた。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、植物の液胞のpHを制御する蛋白質の遺伝子、好ましくは液胞でプロトンを送る蛋白質の遺伝子、より好ましくは $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子を提供しようとするものである。本発明の遺伝子を植物に導入し、発現させることで、花色を調節し、好ましくは青色化することが可能である。

【0013】

【課題を解決するための手段】

従って、本発明は、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子は、好ましくは $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターをコードする遺伝子であり、例えば、配列番号：2記載のアミノ酸配列をコードする遺伝子、あるいは配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して1個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／または他のアミノ酸による置換により修飾されているアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；配列番号：2記載のアミノ酸配列に対して20%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子；あるいは配列番号：2記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する核酸の一部または全部に対して、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子である。

【0014】

本発明はまた、前記の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はまた、前記のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

本発明はまた、前記の遺伝子によってコードされる蛋白質を提供する。

本発明はさらに、前記の宿主細胞を培養し、又は生育させ、そして該宿主細胞



から液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質を採取することを特徴とする該蛋白質の製造方法を提供する。

本発明はまた、前記の遺伝子、または前記のベクターが導入された植物もしくはこれと同じ性質を有するその子孫またはそれらの組織を提供する。

【0015】

本発明はまた、前記の植物又はこれと同じ性質を有するその子孫の切り花を提供する。

本発明はさらに、前記の遺伝子、または前記のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、液胞の pH を制御する方法を提供する。

本発明はさらに、前記の遺伝子、または前記のベクターを植物又は植物細胞に導入し、該遺伝子を発現せしめることによる、植物体の花の色を調節する方法を提供する。

【0016】

【発明の実施の形態】

アサガオの遺伝子座 Purple は優性であると花卉の色は青で、ホモの劣性となると青い花卉が紫となる。この遺伝子座が花の色に関わっていることは明らかではあるが、その機構については不明である。

まず、pr-m 変異体とその復帰突然変異体の花卉色素を化学分析したところ、両者の色素組成に差違は認められなかった。青色花アサガオの蕾は赤紫色で開花に伴って青色に変化するのは、前述のように、花卉細胞液胞の pH 変化によると考えられる。

【0017】

pr-m 変異体では、開花に伴って青色に変化せず、さらに開花した花卉細胞の液胞の pH は、pr-m 変異体のほうが Pr-r に比べて低かった。それゆえ、Purple 遺伝子は開花時の花卉細胞液胞内の pH を制御し、青色を賦与する遺伝子と考えられる。そこで、pr-m 変異体とその復帰突然変異体を用いて、トランスポゾン・ディスプレイ法により、まず pr-m に特異的に存在する Pr 遺伝子配列を含むゲノム DNA の断片を同定し、ついで Pr 遺伝子を同定した。今回得られた Pr 遺伝子は驚くべきこと

にアラビドプシスなどの $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーターと相同性を持ち、pr-m変異はPr遺伝子の5' 非翻訳領域中にトランスポゾンが挿入されていた。

【0018】

本発明の遺伝子としては、例えば配列番号：2に記載するアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質も、もとの蛋白質と同様の活性を維持することが知られている。従って本発明は、液胞のpHを制御する活性を有している蛋白質である限り、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して1個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質および当該蛋白質をコードする遺伝子も本発明に属する。

【0019】

本発明はまた、配列番号：1に記載の塩基配列または配列番号：2に記載のアミノ酸配列をコードする塩基配列、またはそれらの塩基配列の一部をコードする塩基配列に対して、ストリンジェントな条件下、例えば5xSSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。なお、適切なハイブリダイゼーション温度は塩基配列やその塩基配列の長さによって異なり、例えばアミノ酸6個をコードする18塩基からなるDNAフラグメントをプローブとした場合には50℃以下の温度が好ましい。

【0020】

このようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、例えば、ペチュニアやトレニア由来の遺伝子が挙げられるが、植物以外の由来であってもよい。また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。

また、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子はスーパーファミリーを形成しており (FEBS Lett. 424(1998) Debr v et al., p1)、アミノ酸配列で20%以上の相同性を有する (J.Biol.Chem.272(1997) Orlowski et al., p22373)。

## 【0021】

そこで本発明はさらに配列番号：2に記載のアミノ酸配列に対して約20%以上、好ましくは50%以上、例えば60%または70%以上、の相同性を有するアミノ酸配列を有し、且つ液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子に関するものである。

## 【0022】

生来の塩基配列を有する遺伝子は実施例に具体的に示すように、例えばcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするDNAは生来の塩基配列を有するDNAを基礎として、常用の部位特定変異誘発やPCR法を用いて合成することができる。例えば修飾を導入したいDNA断片を生来のcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望の変異を導入したプライマーを用いて部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望の修飾を導入したDNA断片を得る。その後、この変異を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

## 【0023】

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分の配列からなるDNA断片を合成し、連結すればよい。

本発明はアサガオ由来の液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子のみに限定されるものではなく、起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、液胞においてプロトンを汲み出すトポロジールを持っていればよい。

## 【0024】

また、得られた遺伝子が大腸菌または酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、活性を測定することにより、得られた遺伝子が液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードすることを確認することができる。さらに、当該遺伝子を発

現させることにより、遺伝子産物である液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質を得ることができる。あるいはまた、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列に対する抗体を用いても、液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質を得ることができ、抗体を用いて他の生物の液胞の pH を制御する活性を有する蛋白質をクローン化することもできる。

## 【0025】

従って本発明はまた、前述の遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア (*Escherichia*) 属に属する細菌、例えば大腸菌 (*Escherichia coli*)、バシルス (*Bacillus*) 属微生物、例えばバシルス・スブシルス (*Bacillus subtilis*) など常用の宿主を用いることができる。真核性宿主としては、下等真核生物、例えば真核性微生物、例えば真菌である酵母または糸状菌が使用できる。

## 【0026】

酵母としては例えばサッカロミセス (*Saccharomyces*) 属微生物、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられ、また糸状菌としてはアスペルギルス (*Aspergillus*) 属微生物、例えばアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、ペニシリウム (*Penicillium*) 属微生物が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞が使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

## 【0027】

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の種類に依存して発現制御領域、例えばプロモーターおよびターミネーター、複製起点等を含有する。細菌用発現ベクターのプロモーターとしては、常用のプロモーター、例えば *trc* プロモーター、*tac* プロモーター、*lac* プロモーター等が使用され、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター

、PH05プロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、trpC等が使用される。

【0028】

また動物細胞宿主用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レイトプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常用に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も常法に従って行うことができる。

前記の発現ベクターによって形質転換された宿主細胞を培養、栽培または飼育し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破碎、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とするタンパク質を回収、精製することができる。

【0029】

さらに本発明は、液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、具体的には、 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  アンチポーター遺伝子を導入することにより、色合いが調節された植物もしくはその子孫又はこれらの組織に関するものであり、その形態は切り花であってもよい。本発明で得た液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子を用いると、液胞においてプロトンの細胞質への汲み出しとナトリウムイオンの汲み入れを行うことができ、液胞内に蓄積しているアントシアニンを青くでき、結果として花の色を青くすることができる。

【0030】

また、本発明の遺伝子の発現を抑制することにより、液胞のpHを下げることも可能であろう。現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法やコサプレッション法によって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。

【0031】

形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニ

ア、チューリップ、イネ、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

【0032】

【実施例】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

実施例 1. 生殖細胞復帰突然変異体の取得

生殖細胞復帰突然変異体の取得に関しては、すでに報告がある(植物細胞工学シリーズ 5 (1996) p132, 飯田ら 秀潤社、Annal. New York Acad. Sci., (1999) Iida et al. p870、Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p 375、Theor. Appl. Genet. 92 (1996) Inagaki et al. p499)。

【0033】

遺伝子型 (Pr-r/pr-m) を有するアサガオ(Iida et al. p870、Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p 375、Theor. Appl. Genet. 92 (1996) Inagaki et al. p499) を自家受粉し、後代の種子を蒔き、それら自殖後代の花を観察して、復帰突然変異により青花を咲かせる個体を選抜し、さらにこの生殖細胞復帰突然変異体の自殖後代で、紫花を咲かせる分離体を得られるか否かでホモかヘテロかを検証し、遺伝子型 (Pr-r/ Pr-r) および (pr-m/pr-m) を有するものを選択した。

【0034】

実施例 2. 復帰変異体花卉のアントシアニン

アサガオに含まれるアントシアニンはおもにヘブンリブルーアントシアニンであり、その他にいくつかのアントシアニンが含まれる (Phytochemistry 31 (1992) Lu et al. P659)。実施例 1 で得られた Pr-r/ Pr-r 株と pr-m/pr-m 株の開いた花卉を同様に解析したところ、両者に含まれるアントシアニンはほぼ同一であった。

【0035】

セロハンテープを表側の花卉に貼り、剥がすことにより一層の上皮細胞だけを

回収し、ここから細胞液をメスなどで掻き取り遠心して搾汁を得た。搾汁をホリバB212 pH メーター（堀場製作所）にてpHを測定した。Pr-r/ Pr-r株の花弁上皮細胞のpHは約7.1であったのに対し、pr-m/pr-m株の花弁上皮細胞のpHは約6.5であった。この結果は、purpleの変異による花色の変化は、アントシアニンの構造によるものではなく液胞のpHの変化によるものであることを示す。

【0036】

実施例 3. pr-m に特異的に存在するゲノム断片の単離

遺伝子の単離にはトランスポゾンディスプレイ法（たとえばPlant J. 13 (1998) Frey et al. p 717, Plant J. 13 (1998) Van den Broeck et al. p121) あるいは類似の方法（植物細胞工学シリーズ7（1997）、土生ら、p144、秀潤社）を用い、pr-m/pr-m株とPr-w/pr-m株には存在し、Pr-r/ Pr-r株と野性株には存在しないDNA のバンドを探した。アサガオにおいてはTpn1関連のトランスポゾンが主に易変異性に関与していると考えられるので、ここでもTpn1関連のトランスポゾンに着目した。

【0037】

具体的には、pr-m/pr-m株から染色体DNAを抽出し、125ngを20μl中でMseIで消化した。消化したDNAに80 pmoleのMseIアダプター（5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'（配列番号：3）と5'-TACTCAGGACTCAT-3'（配列番号：4）をアニールしたもの）を25μl中で20℃で2時間付加した。75℃で10分間保持した後、-20℃で保管した。これを10倍希釈した後、2μlを鋳型とし、これを4.8 pmoleのTIRプライマー（5'-TGTGCATTTTCTTGTAGTG-3'（配列番号：5））、トランスポゾンTpn1の末端逆位繰返し配列を含む）と4.8 pmoleのMseIプライマー（5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'）（配列番号：6）を用いて20μl中でPCRにより増幅した。

【0038】

PCRは、Taqポリメラーゼ（Takara）94℃0.5分、56℃1分、72℃1分を1サイクルとし、20サイクル反応し、10倍に希釈した。このうち2μlを鋳型として、4.8 pmoleのTIR+Nプライマー（5'-TGTGCATTTTCTTGTAGN-3'（配列番号：7）N=A, C, G またはT. 混合ではなく4種合成する。）と4.8 pmoleのMseI+Nプライマー（5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'（配列番号：8）N=A, C, G またはT.混合

ではなく4種合成する。5'端をフルオロセインで標識（アマシャムファルマシア社Vistra fluorescence 5'-オリゴラベリングキットを使用）を用いて20 $\mu$ l中でPCRを行った。

【0039】

反応はそれぞれのプライマーの組み合わせで行うため16反応をおこなう。PCRは、94℃0.5分、65℃1分（1サイクルごとに0.7℃ずつ下げる）、72℃1分を1サイクルとし、13サイクル反応し、さらに94℃0.5分、56℃1分、72℃1分を1サイクルとし、13サイクル反応した。同様の操作をPr-r/Pr-r株から得た染色体DNAについても行い、DNAシーケンサー377（アプライドバイオシステム社）のシーケンスゲルにて電気泳動を行い、FMBIOII（Takara）を用いてバンドを検出した。

【0040】

Pr-r/Pr-r株とpr-m/pr-m株由来のバンドを比較したところ、約130bpのDNA断片がpr-mを有する株に特異的に発現していた。この130bpのDNA断片を回収し、20 pmole TIRプライマーと20 pmole MseI プライマーを用いてPCR（94℃0.5分、56℃1分、72℃1分を1サイクルとし、30サイクル反応）により増幅し、pGEM-Tベクター（プロメガ社）にサブクローニングし、塩基配列を決定した。その配列は、

【0041】

【化1】

5'-TGAGCATTTTTCTTGTAGTG CTGAGATTTTCCTCCATTGTCTGAAGCTCTTCATCCTTCAACAC  
TACCCCCACATCTCACCTTTCAAG GTCCAATCTTTATCATTCATCT TTACTCAGGACTCATCGTC-3'

（配列番号：9）

【0042】

であった（1本下線部は使用したプライマー、2本下線はエクソン、その他はイントロンに対応）。配列番号：9に記載の配列をプローブとしてノザン解析を



行ったところ、Pr-rを有するアサガオの蕾には約2.3kb の転写産物が存在したが、pr-m/pr-m 株には対応する転写産物は存在しなかった。従って、この2.3kb の転写産物がPr遺伝子に対応することがわかった。

【0043】

#### 実施例 4. cDNA の単離

野生株アサガオ(Pr-w/Pr-w) 由来のcDNAライブラリー(Plant Cell, 6 (1994) Inagaki et al. p375)の約600 万個クローンを130bpDNA断片をプローブとしてスクリーニングし、2 クローンの陽性クローンを得た。そのうち1クローンは、2237 bp のcDNAを持ち、その中には1626bpからなるオープンリーディングフレームが見られた(配列番号: 1)。予測されるアミノ酸配列は、酵母とアラビドプシスの $\text{Na}^+ -\text{H}^+$  アンチポーター(それぞれNhxl, AtNhxl, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) Gaxiola et al. p1480 ~1485) に対して29.3 %, 73.4% の同一性を示した。

【0044】

この結果からアサガオのPurpleは $\text{Na}^+ -\text{H}^+$  アンチポーターをコードしているという予想外の結果が得られた。アラビドプシスから得られた $\text{Na}^+ -\text{H}^+$  アンチポーターは、酵母において耐塩性を与えるタンパク質として注目されているが、 $\text{Na}^+ -\text{H}^+$  アンチポーターと花の色との関連が見出されたのは今回が初めてである。

【0045】

#### 実施例 5. 植物での発現ベクターの構築

アサガオPurple cDNA10ng を鋳型として、合成プライマーPR-5 (5'-GGGATCC AACAAAAATGGCTGTCGGG-3') (配列番号: 10) とPR-3 (5'-GGGTCGACTAAGCATCAAAACATAGAGCC -3') (配列番号: 11) を用いてPCR を行った。ポリメラーゼは、Taq ポリメラーゼ(東洋紡)を使用し、95℃45秒反応後、95℃45秒、50℃45秒、72℃45秒を1 サイクルとし、25サイクル反応し、さらに72度で10分反応した。得られた約1.6 kbのDNA 断片をpCR2.1-T p (Clonetech 社) にライゲーションし、pCR-purpleとした。このプラスミド上のPurple cDNA の塩基配列にPCR によるエラーがないことを確認した。

## 【0046】

pBE2113-GUS (Plant Cell Physiol. 37 (1996) Mitsuhashi et al. p49) を SacI で消化し、平滑末端化した後、XhoI リンカー (東洋紡) を挿入し、得られたプラスミドを pBE2113-GUSx とした。これを EcoRI と HindIII で消化して得られる約 2.7 kb の DNA 断片を pBinPLUS の HindIII と EcoRI 消化物と連結し、得られたプラスミドを pBEXP とした。

## 【0047】

一方、pCGP484 (特表平 8 - 5 1 1 6 8 3 に記載) を HindIII と XbaI で消化して得られる約 1.2 kb の DNA 断片と、pCR-purpl を XbaI と SalI で消化して得られる約 1.6 kb の DNA 断片と、pBEXP を HindIII と XhoI で消化して得られる約 13 kb の DNA 断片をライゲーションし、pSPB607 を得た。このプラスミドは、アグロバクテリウムによる植物の形質転換用のバイナリーベクターで、このプラスミド上で、Purple cDNA は、キンギョソウ由来カルコンシンターゼプロモーターと、アグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼターミネーターの制御下にある。

## 【0048】

また、pCGP669 (特表平 8 - 5 1 1 6 8 3 に記載) を HindIII と BamHI で消化して得られる約 0.8 kb の DNA 断片と、pCR-purpl を I と BamHI と SalI で消化して得られる約 1.6 kb の DNA 断片と、pBEXP を HindIII と XhoI で消化して得られる約 13 kb の DNA 断片をライゲーションし、pSPB608 を得た。このプラスミドは、アグロバクテリウムによる植物の形質転換用のバイナリーベクターで、このプラスミド上で、Purple cDNA は、ペチュニア由来カルコンシンターゼA プロモーターと、アグロバクテリウム由来のノパリンシンターゼターミネーターの制御下にある。

このようにして得られた発現ベクターを用いて植物の形質転換を行うことにより、液胞の pH を制御し、花色を調節することができる。

## 【0049】

## 【発明の効果】

本発明により得られた遺伝子が液胞の pH および花の色の調節に関わっていることがはじめて明らかとなった。また、本発明の遺伝子を花卉で発現することにより、液胞の pH を上昇させ、花の色を青く変化させることができる。また、本発明

の遺伝子の発現を抑制することにより、液胞のpHを低下させ、花の色を赤く変化させることができる。液胞のpHを制御する蛋白質をコードする遺伝子としては、本発明において得られたアサガオ由来のものだけでなく、他の生物の同様な遺伝子も用いることができる。

【0 0 5 0】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- < 1 1 0 > SUNTORY LIMITED
- < 1 2 0 > Gene coding for protein having an activity to control pH in vacuoles
- < 1 3 0 > 994020
- < 1 6 0 > 11
- < 2 1 0 > 1
- < 2 1 1 > 2237
- < 2 1 2 > DNA
- < 2 1 3 > Ipomea nil
- < 2 2 3 > Nucleotide sequence of DNA coding for protein having an activity to control pH in vacuoles
- < 4 0 0 > 1

```

agaatgtagg ctacagaaat ttccagacag atagatacat aaatccgtat aatagagaca 60
gagaaacaga aaaagagaga gtcacgttaa tcctgagatt ttccctccatt tgtctgaagc 120
tcttcatcct tcaacactac ccccatatct cacctttcaa gtgatttgta tgttttcggg 180
agggattgga atgggcaacc cggatatgtg aacagaaacc acgacattgg gaaaagattt 240
attgcaaaaa ttgttttgat tgttttggat tttgtggtag aaaaagggga agaacaaaa 299
atg gcg ttc ggg ttg tct tct ttg ctc caa aat tcg gat ttg ttc acg 347
Met Ala Phe Gly Leu Ser Ser Leu Leu Gln Asn Ser Asp Leu Phe Thr
    1           5           10           15
tct gat cat gct tcc gtt gtg tcg atg aac ctc ttt gtg gcg ttg ctt 395
Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Met Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu
           20           25           30
tgc gca tgc att gtt ctt ggc cat cta ctc gag gag aat cgc tgg gtg 443
Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val
    35           40           45

```

aac gaa tcc att act gcc ctt ata att ggt ttg tgc acc gga gtt gta	491
Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val	
50 55 60	
att ttg ctc ctt agc gga gga aag agt tca cat ctt ctc gtc ttt agc	539
Ile Leu Leu Leu Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser	
65 70 75 80	
gaa gat ctt ttc ttt ata tat ctc ctg cca cct ata ata ttc aat gcg	587
Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala	
85 90 95	
ggg ttt caa gtg aaa aag aag cag ttt ttc gtg aac ttc atg aca att	635
Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Gln Phe Phe Val Asn Phe Met Thr Ile	
100 105 110	
atg ctg ttt gga gct att ggc aca ctt att agc tgt tct att ata tca	683
Met Leu Phe Gly Ala Ile Gly Thr Leu Ile Ser Cys Ser Ile Ile Ser	
115 120 125	
ttt ggt gcg gtc aaa att ttc aag cac tta gac att gac ttt ctg gat	731
Phe Gly Ala Val Lys Ile Phe Lys His Leu Asp Ile Asp Phe Leu Asp	
130 135 140	
ttt gga gat tat tta gca att ggt gcg ata ttt gct gca acc gat tct	779
Phe Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser	
145 150 155 160	
gtt tgc aca ttg cag gtg ctc agt cag gat gag acg ccc cta ctt tac	827
Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr	
165 170 175	
agt ctc gtg ttt gga gaa ggg gtc gtc aat gat gct aca tct gtg gtc	875
Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val	
180 185 190	

ctt ttt aat gct att caa agt ttt gac atg act agt ttt gat cca aaa	923
Leu Phe Asn Ala Ile Gln Ser Phe Asp Met Thr Ser Phe Asp Pro Lys	
195 200 205	
att ggg ctt cat ttc att gga aac ttc ttg tat tta ttt ctc tcg agc	971
Ile Gly Leu His Phe Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Ser	
210 215 220	
act ttt ttg ggc gtg gga att gga ctg ctt tgt gct tat att atc aaa	1019
Thr Phe Leu Gly Val Gly Ile Gly Leu Leu Cys Ala Tyr Ile Ile Lys	
225 230 235 240	
aag cta tac ttt ggc agg cac tca acc gat cgt gag gtt gcc ctt atg	1067
Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met	
245 250 255	
atg ctc atg tct tac ttg tct tat ata atg gcc gag tta ttc tat cta	1115
Met Leu Met Ser Tyr Leu Ser Tyr Ile Met Ala Glu Leu Phe Tyr Leu	
260 265 270	
agc ggc ata ctt act gta ttc ttc tgt gga att gtc atg tct cat tat	1163
Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr	
275 280 285	
acc tgg cac aat gtt acc gag agc tca agg gtc act act agg cat tcc	1211
Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Arg His Ser	
290 295 300	
ttt gca act ctg tca ttt gtc gca gag aca ttt atc ttc ctc tat gtt	1259
Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Thr Phe Ile Phe Leu Tyr Val	
305 310 315 320	
ggg atg gat gcc ttg gat atc gag aaa tgg aaa ttt gtg aaa aat agt	1307
Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Lys Asn Ser	
325 330 335	

cag gga cta tca gtt gca gtg agc tca ata ttg gta ggc cta atc tta	1355
Gln Gly Leu Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Leu Val Gly Leu Ile Leu	
340 345 350	
gta ggc aga gct gcg ttc gta ttc ccc ttg tcg ttt tta tcc aac tta	1403
Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu	
355 360 365	
gca aag aaa aac tct tcg gac aag ata tcc ttt agg caa caa ata ata	1451
Ala Lys Lys Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ser Phe Arg Gln Gln Ile Ile	
370 375 380	
att tgg tgg gct ggc cta atg aga ggc gcc gtc tca ata gca ctt gcg	1499
Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala	
385 390 395 400	
tat aat aag ttt aca acc tcg ggg cat acg tca ttg cac gag aac gca	1547
Tyr Asn Lys Phe Thr Thr Ser Gly His Thr Ser Leu His Glu Asn Ala	
405 410 415	
ata atg att aca agt act gtt acg gtt gtt ctg ttc agc aca gtt gta	1595
Ile Met Ile Thr Ser Thr Val Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val	
420 425 430	
ttc ggg ttg atg acg aag cct ctg ata aac ctt ctg cta ccc ccg cac	1643
Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Leu Pro Pro His	
435 440 445	
aag cag atg cca agc ggt cat tcg tca atg aca aca tcc gaa ccc agt	1691
Lys Gln Met Pro Ser Gly His Ser Ser Met Thr Thr Ser Glu Pro Ser	
450 455 460	
agt ccg aag cac ttc acg gtg cca ctc ctg gac aac caa cct gac tca	1739
Ser Pro Lys His Phe Thr Val Pro Leu Leu Asp Asn Gln Pro Asp Ser	
465 470 475 480	

gaa agc gat atg ata acc gga cct gag gtt gct cga cca act gcc ttg 1787

Glu Ser Asp Met Ile Thr Gly Pro Glu Val Ala Arg Pro Thr Ala Leu

485

490

495

cgc atg ctg cta agg acg cca acc cac acc gtg cac cgc tac tgg cgt 1835

Arg Met Leu Leu Arg Thr Pro Thr His Thr Val His Arg Tyr Trp Arg

500

505

510

aag ttt gat gat tcg ttt atg cgt ccc gtg ttt ggc ggg cgg gga ttc 1883

Lys Phe Asp Asp Ser Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe

515

520

525

gtt ccg ttt gtc gcg ggc tca cca gtt gag cag agc cct aga tga 1928

Val Pro Phe Val Ala Gly Ser Pro Val Glu Gln Ser Pro Arg \*\*\*

530

535

540

ggtacaaagt acaaacaaga cactgttgct gggtgaaata gtgtaagttg tatcatagtt 1988

gattctggtt gccctcttta tgaaatgggc tgggtgaaag tcttctcact agctaggttg 2048

cattgcattg ctacttcata aatgttttat tttattttgt aaatgttggt gcattttagg 2108

tacttgattt aacacctcat ttgtagcata ttatttggtta cagagtattt tttttatgaa 2168

acaataatgg ctgaattatc aatttggctc tatgttttga tgcttagtaa aaaaaaaaaa 2228

aaaaaaaaa 2237

[ 0 0 5 1 ]

< 2 1 0 > 2

< 2 1 1 > 542

< 2 1 2 > PRT

< 2 1 3 > Ipomea nil

< 2 2 3 > Amino acid sequence of protein having an activity to control  
pH in vacuoles

< 4 0 0 > 2

Met Ala Phe Gly Leu Ser Ser Leu Leu Gln Asn Ser Asp Leu Phe Thr

1

5

10

15



Ser Asp His Ala Ser Val Val Ser Met Asn Leu Phe Val Ala Leu Leu  
 20 25 30  
 Cys Ala Cys Ile Val Leu Gly His Leu Leu Glu Glu Asn Arg Trp Val  
 35 40 45  
 Asn Glu Ser Ile Thr Ala Leu Ile Ile Gly Leu Cys Thr Gly Val Val  
 50 55 60  
 Ile Leu Leu Leu Ser Gly Gly Lys Ser Ser His Leu Leu Val Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Leu Phe Phe Ile Tyr Leu Leu Pro Pro Ile Ile Phe Asn Ala  
 85 90 95  
 Gly Phe Gln Val Lys Lys Lys Gln Phe Phe Val Asn Phe Met Thr Ile  
 100 105 110  
 Met Leu Phe Gly Ala Ile Gly Thr Leu Ile Ser Cys Ser Ile Ile Ser  
 115 120 125  
 Phe Gly Ala Val Lys Ile Phe Lys His Leu Asp Ile Asp Phe Leu Asp  
 130 135 140  
 Phe Gly Asp Tyr Leu Ala Ile Gly Ala Ile Phe Ala Ala Thr Asp Ser  
 145 150 155 160  
 Val Cys Thr Leu Gln Val Leu Ser Gln Asp Glu Thr Pro Leu Leu Tyr  
 165 170 175  
 Ser Leu Val Phe Gly Glu Gly Val Val Asn Asp Ala Thr Ser Val Val  
 180 185 190  
 Leu Phe Asn Ala Ile Gln Ser Phe Asp Met Thr Ser Phe Asp Pro Lys  
 195 200 205  
 Ile Gly Leu His Phe Ile Gly Asn Phe Leu Tyr Leu Phe Leu Ser Ser  
 210 215 220  
 Thr Phe Leu Gly Val Gly Ile Gly Leu Leu Cys Ala Tyr Ile Ile Lys  
 225 230 235 240

Lys Leu Tyr Phe Gly Arg His Ser Thr Asp Arg Glu Val Ala Leu Met			
245	250	255	
Met Leu Met Ser Tyr Leu Ser Tyr Ile Met Ala Glu Leu Phe Tyr Leu			
260	265	270	
Ser Gly Ile Leu Thr Val Phe Phe Cys Gly Ile Val Met Ser His Tyr			
275	280	285	
Thr Trp His Asn Val Thr Glu Ser Ser Arg Val Thr Thr Arg His Ser			
290	295	300	
Phe Ala Thr Leu Ser Phe Val Ala Glu Thr Phe Ile Phe Leu Tyr Val			
305	310	315	320
Gly Met Asp Ala Leu Asp Ile Glu Lys Trp Lys Phe Val Lys Asn Ser			
325	330	335	
Gln Gly Leu Ser Val Ala Val Ser Ser Ile Leu Val Gly Leu Ile Leu			
340	345	350	
Val Gly Arg Ala Ala Phe Val Phe Pro Leu Ser Phe Leu Ser Asn Leu			
355	360	365	
Ala Lys Lys Asn Ser Ser Asp Lys Ile Ser Phe Arg Gln Gln Ile Ile			
370	375	380	
Ile Trp Trp Ala Gly Leu Met Arg Gly Ala Val Ser Ile Ala Leu Ala			
385	390	395	400
Tyr Asn Lys Phe Thr Thr Ser Gly His Thr Ser Leu His Glu Asn Ala			
405	410	415	
Ile Met Ile Thr Ser Thr Val Thr Val Val Leu Phe Ser Thr Val Val			
420	425	430	
Phe Gly Leu Met Thr Lys Pro Leu Ile Asn Leu Leu Leu Pro Pro His			
435	440	445	
Lys Gln Met Pr Ser Gly His Ser Ser Met Thr Thr Ser Glu Pro Ser			
450	455	460	

Ser Pro Lys His Phe Thr Val Pro Leu Leu Asp Asn Gln Pro Asp Ser  
 465                      470                      475                      480  
 Glu Ser Asp Met Ile Thr Gly Pro Glu Val Ala Arg Pro Thr Ala Leu  
                     485                      490                      495  
 Arg Met Leu Leu Arg Thr Pro Thr His Thr Val His Arg Tyr Trp Arg  
                     500                      505                      510  
 Lys Phe Asp Asp Ser Phe Met Arg Pro Val Phe Gly Gly Arg Gly Phe  
                     515                      520                      525  
 Val Pro Phe Val Ala Gly Ser Pro Val Glu Gln Ser Pro Arg  
                     530                      535                      540

【0 0 5 2】

- <2 1 0>    3
- <2 1 1>    16
- <2 1 2>    DNA
- <2 1 3>    Artificial sequence
- <2 2 0>
- <2 2 1>
- <2 2 2>
- <2 2 3>    MseI adaptor
- <4 0 0>    3

gacgatgagt cctgag

16

【0 0 5 3】

- <2 1 0>    4
- <2 1 1>    14
- <2 1 2>    DNA
- <2 1 3>    Artificial sequence
- <2 2 0>
- <2 2 1>
- <2 2 2>

< 2 2 3 >    MseI adaptor	
< 4 0 0 >    4	
tactcaggac tcat	14
【 0 0 5 4 】	
< 2 1 0 >    5	
< 2 1 1 >    20	
< 2 1 2 >    DNA	
< 2 1 3 >    Artificial sequence	
< 2 2 0 >	
< 2 2 1 >	
< 2 2 2 >	
< 2 2 3 >    TIR primer	
< 4 0 0 >    5	
tgtgcatttt tctttagtg	20
【 0 0 5 5 】	
< 2 1 0 >    6	
< 2 1 1 >    16	
< 2 1 2 >    DNA	
< 2 1 3 >    Artificial sequence	
< 2 2 0 >	
< 2 2 1 >	
< 2 2 2 >	
< 2 2 3 >    MseI primer	
< 4 0 0 >    6	
gatgagtcct gagtaa	16
【 0 0 5 6 】	
< 2 1 0 >    7	
< 2 1 1 >    19	
< 2 1 2 >    DNA	

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > TIR+N primer

< 4 0 0 > 7

tgtgcatttt tcttgtagn

19

[ 0 0 5 7 ]

< 2 1 0 > 8

< 2 1 1 > 17

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 > MseI+N primer

< 4 0 0 > 8

gatgagtcct gagtaan

17

[ 0 0 5 8 ]

< 2 1 0 > 9

< 2 1 1 > 130

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 1 >

< 2 2 2 >

< 2 2 3 >

< 4 0 0 > 9

tgagcatttt tctttagtg ctgagatttt cctccatttg tctgaagctc ttcaccttc 60

aacactaccc ccacatctca cctttcaagg tccaatcttt atcattcatc tttactcagg 120  
actcatcgtc 130

【0 0 5 9】

<2 1 0> 10  
<2 1 1> 26  
<2 1 2> DNA  
<2 1 3> Artificial sequence  
<2 2 0>  
<2 2 1>  
<2 2 2>  
<2 2 3> PR-5 primer  
<4 0 0> 10

gggatccaac aaaaatggct gtcggg 26

【0 0 6 0】

<2 1 0> 11  
<2 1 1> 29  
<2 1 2> DNA  
<2 1 3> Artificial sequence  
<2 2 0>  
<2 2 1>  
<2 2 2>  
<2 2 3> PR-3 primer  
<4 0 0> 11

gggtcgacta agcatcaaaa catagagcc 29

【図面の簡単な説明】

【図 1】

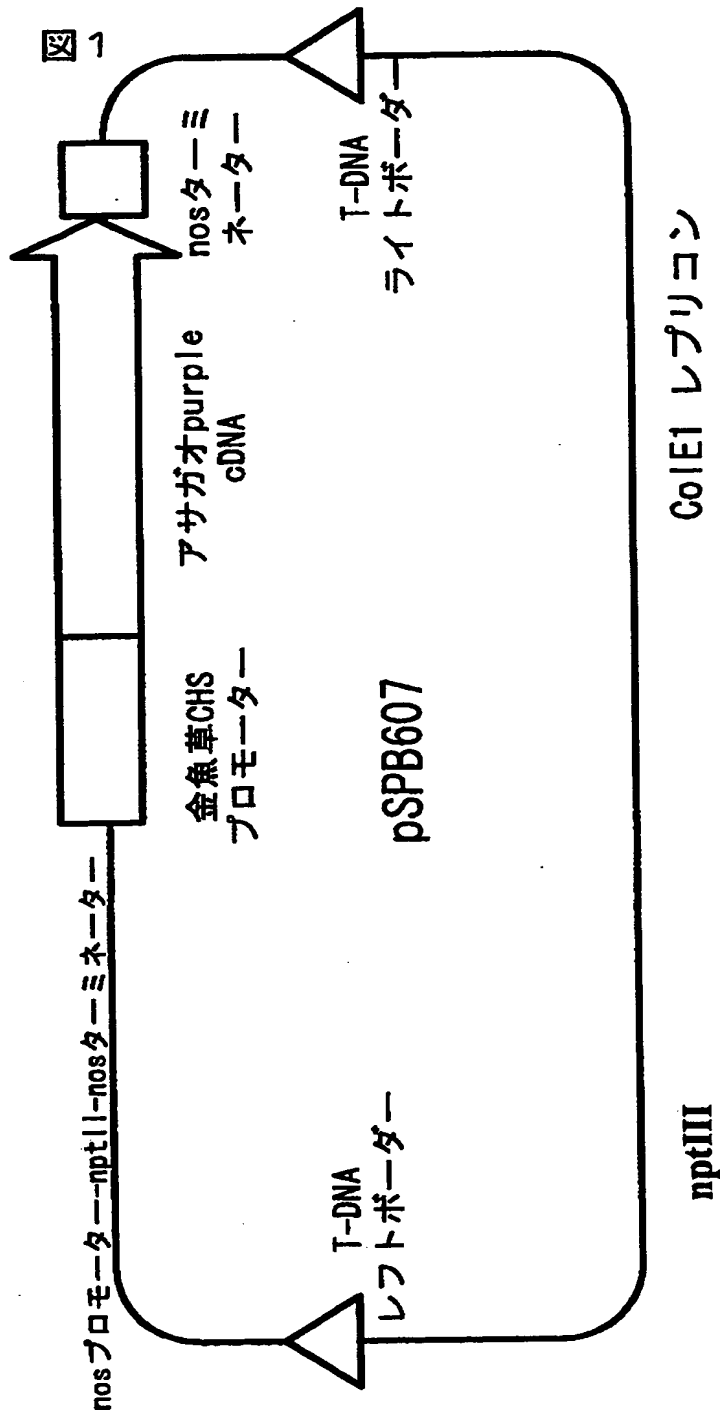
図 1 は、プラスミド p SPB 6 0 7 の構造を示す図である。

【図 2】

図 2 は、プラスミド p SPB 6 0 8 の構造を示す図である。

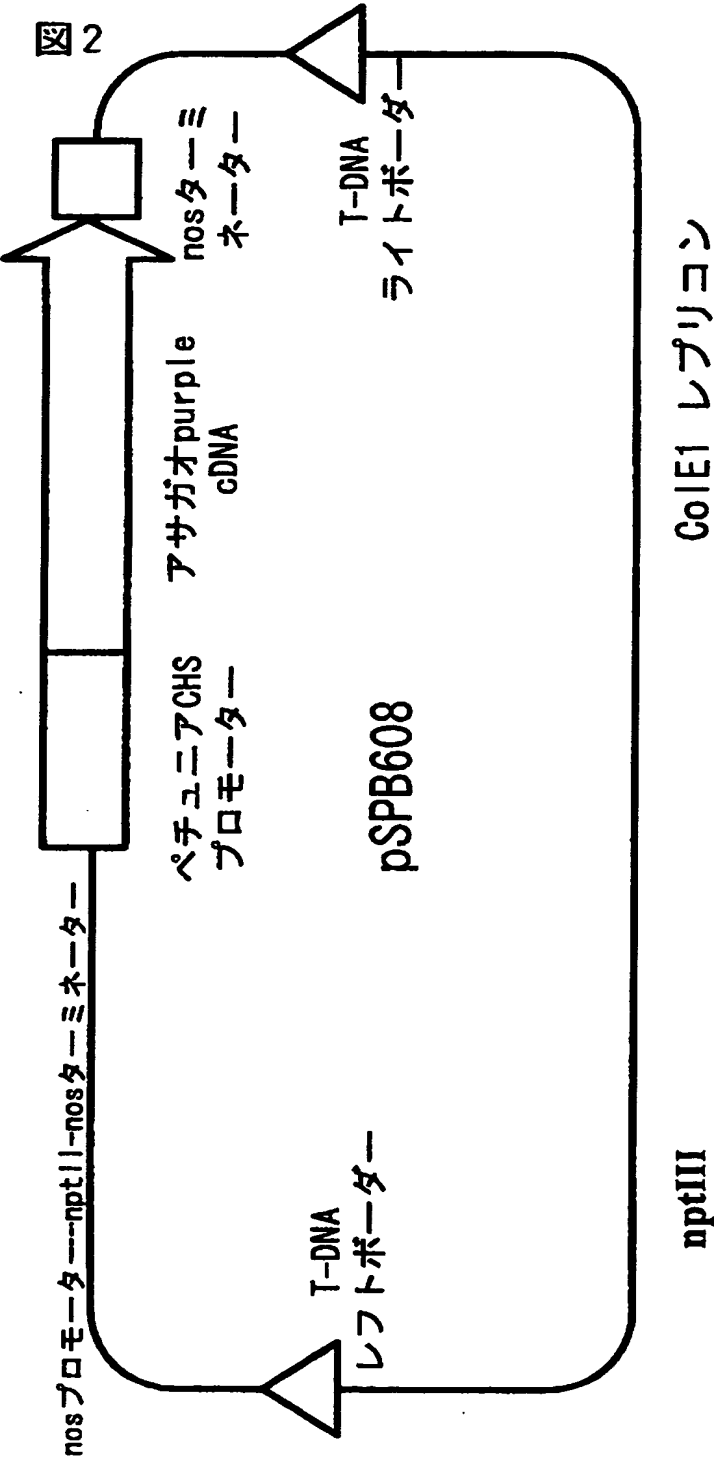
【書類名】 図面

【図 1】





【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 植物の花の色を制御するなどの目的のために、液胞のpHを制御する新規な手段の提供。

【解決手段】 液胞のpHを制御する活性を有する蛋白質をコードする遺伝子、例えばアサガオに由来し、配列番号：2に示すようなアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子を提供する。この遺伝子を植物に挿入して発現せしめることにより、液胞のpHの調節を介して花の色を制御することができる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

1. 変更年月日	1990年 8月13日
[変更理由]	新規登録
住 所	大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
氏 名	サントリー株式会社

